

Научно-практическая конференция «Онкогинекология»
18 октября 2019 года
г. Москва

«Молекулярно-генетическое тестирование для персонализированной терапии рака яичников»

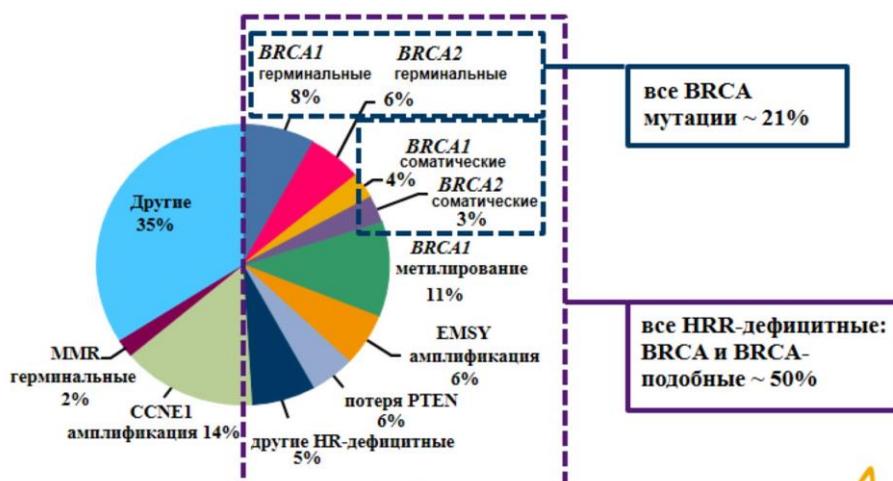
Кекеева Т. В., ведущий научный сотрудник
Лаборатория эпигенетики
ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»

Лекция при поддержке компании «АстраЗенека»

Представлена только информация в рамках зарегистрированных в РФ показаний
Мнение лектора не всегда может совпадать с точкой зрения компании «АстраЗенека»

Молекулярно-генетические нарушения при серозном

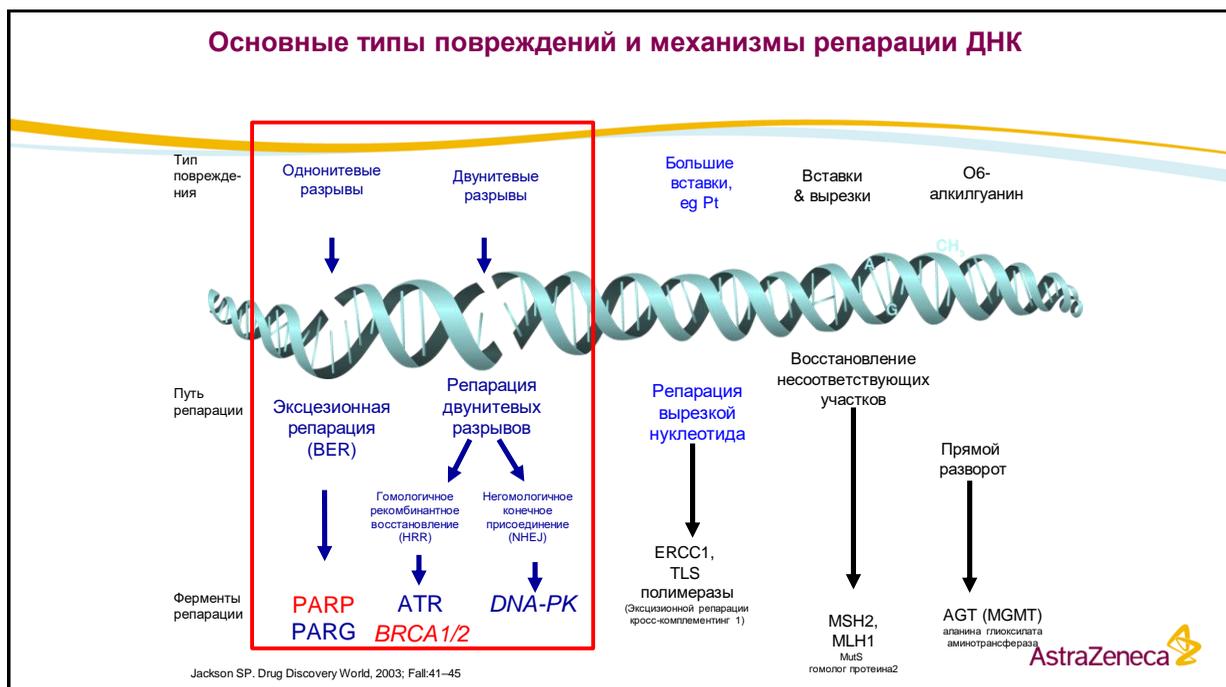
высококлеточном раке яичников: около половины случаев обусловлено мутацией генов, задействованных в репарации путём гомологичной рекомбинации (*homology recombination repair, HRR*) [к содержанию](#)



7

Levine D. The Cancer Genome Atlas, Molecular profiling of serous ovarian cancer, 2011.
From PARP inhibitors in ovarian cancer. Chapter 14.





Синдром наследственного РМЖ/РЯ

- Самый частый (90% от всех наследственных синдромов с РЯ)
- Молодой возраст РМЖ (<45-50 лет)
- Любой возраст РЯ
- Билатеральный РМЖ
- Первично-множественный РМЖ и РЯ
- Родственники с РМЖ, РЯ, раком поджелудочной железы и раком предстательной железы

РМЖ – рак молочной железы

РЯ – рак яичников

Суслицын Е.Н. Наследственные опухолевые синдромы, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова», Санкт-Петербург, 2013 27с

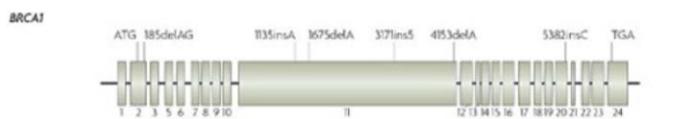
AstraZeneca

Структура генов BRCA

[к содержанию](#)

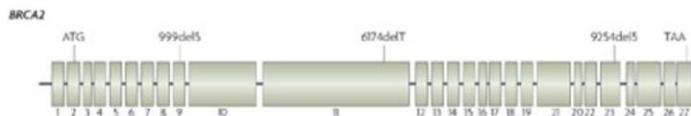
BRCA1

24 экзона
5592 п.н.
1863 а.о.



BRCA2

27 экзона
10257 п.н.
3418 а.о.



Nature Reviews | Cancer

Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. Nat Rev Cancer. 2007 Dec;7(12):937-48.



Отличия между BRCA1- и BRCA2-зависимыми опухолями

Тип рака	Общепопуляционная частота	Носители мутаций BRCA1	Носители мутаций BRCA2
Молочная железа	12.5%	55 – 85%	33 – 86%
Подтип РМЖ		Трижды негативный	ER-позитивный
Поражение второй железы	3.5%	27%	40%
Яичники	1.43%	40 – 45%	10 – 20%
Предстательная железа	4 – 6%	9%	20%
Грудная железа у мужчин	Меньше 1%	6%	4 – 14%
Поджелудочная железа	0.6%	-	6 – 7%

Dornchek S and Weber B. Oncogene 2006;25(43):5825–5831. Antoniou A, et al. Am J Hum Genet 2003;72(5):1117–1130.



Виды мутаций BRCA1/2

Наследственные

- 1) Фаундер (характерные для какой-либо популяции) Могут встречаться от 10 до 80% в зависимости от популяции
- 2) Частые (более 1%)
- 3) Редкие (менее 1%)

Соматические

Нет частых соматических мутаций
Только редкие мутации

7

AstraZeneca 

Рекомендованная классификация мутаций в генах, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (по степени клинической значимости мутаций)

[к содержанию](#)

Класс	Описание (англ)	Описание (рус)	Вероятность патогенности
5	<i>Definitely Pathogenic</i>	Несомненно патогенная	>0.99
4	<i>Likely Pathogenic</i>	Вероятно патогенная	0.95–0.99
3	<i>Uncertain</i>	Неясной значимости	0.05–0.949
2	<i>Likely Not Pathogenic or of Little Clinical Significance</i>	Вероятно непатогенная или низкого клинического значения	0.001–0.049
1	<i>Not Pathogenic or of No Clinical Significance</i>	Непатогенная или не имеющая клинического значения	<0.001

- ✓ следует избегать определения «неклассифицированная» (*unclassified*) мутация, кроме как для вариантов последовательности на этапах исследования, предшествующих оценке их клинической значимости

11 Pion ES et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.* 2008 Nov; 29(11): 1282–1291.

 Zeneca 

[к содержанию](#)

Рекомендации по тестированию родственников в зависимости от класса мутации, обнаруженной у пробанда

Класс	Рекомендации по клиническому тестированию	Рекомендации по наблюдению за родственниками, у которых обнаружена мутация	Тестирование родственников в рамках научных проектов
5	Родственникам, имеющим риск наследования мутации, следует рекомендовать тестирование на наличие данной мутации	Следовать рекомендациям по наблюдению в ситуациях высокого риска развития заболевания (т.н. <i>high-risk surveillance guidelines</i>)	Не показано
4	Родственникам, имеющим риск наследования мутации, следует рекомендовать тестирование на наличие данной мутации	Следовать рекомендациям по наблюдению в ситуациях высокого риска развития заболевания (т.н. <i>high-risk surveillance guidelines</i>)	Может быть полезно для уточнения класса мутации
3	Не следует проводить поиск мутации у родственников пробанда и использовать статус мутации для предсказания риска развития заболевания	Полагаться на семейную историю и другие факторы риска	
2	Не следует проводить поиск мутации у родственников пробанда и использовать статус мутации для предсказания риска развития заболевания	Вести наблюдение так же, как при отсутствии предрасполагающей к развитию заболевания мутации	Не показано
1	Не следует проводить поиск мутации у родственников пробанда и использовать статус мутации для предсказания риска развития заболевания	Вести наблюдение так же, как при отсутствии предрасполагающей к развитию заболевания мутации	

12

Pion ES et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. Hum Mutat. 2008 Nov; 29(11): 1282–1291.



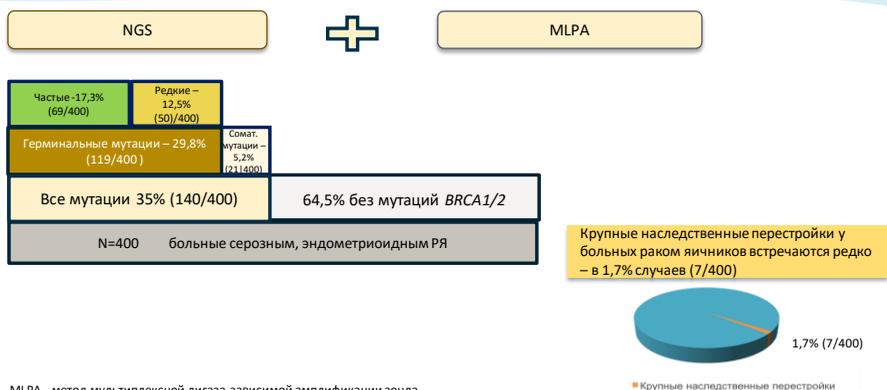
Варианты заключений

1. Патогенная мутация обнаружена → консультация генетика
2. Патогенная мутация не обнаружена → консультация не нужна
3. Найдена мутация с неизвестной клинической значимостью (VUS) → рекомендована консультация генетика

10



Ovatar*: промежуточный анализ – мутации *BRCA1/2* (N=400)



MLPA - метод мультиплексной лигаза-зависимой амплификации зонда

Tuyuyandina AS et al. Profile of *BRCA1/BRCA2* mutations in Russian ovarian cancer population detected by NGS and MLPA analysis: Interim results of OVATAR study. AACR 2018 abstr#1241p328 <http://www.aacr.org/Meetings/MeetingDetail.aspx?EventID=136&DetailID=708#Wz3bdNizaj> дата обращения июль 2018

* ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02122588 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02122588?term=ovatar&rank=1>

AstraZeneca

[к содержанию](#)

Рекомендации и руководства по проведению *BRCA*-тестирования (3 из 3)



RUSSCO

ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБЩЕСТВО
ОНКОЛОГОВ-ХИМИОТЕРАПЕВТОВ

Практические рекомендации по лекарственному лечению злокачественных опухолей RUSSCO:

Для всех больных с серозными и эндометриoidными карциномами высокой степени злокачественности целесообразно генетическое консультирование и определение мутации *BRCA1* и 2

22 Тюляндина С. А., Денгылина Н. В., Коломиец Л. А., Морхов К. Ю., Нечушкина В. М., Покатаев И. А. и соавт. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛЕКАРСТВЕННОМУ ЛЕЧЕНИЮ РАКА ЯИЧНИКОВ / ПЕРВИЧНОГО РАКА БРЮШИНЫ / РАКА МАТОЧНЫХ ТРУБ // Злокачественные опухоли. – 2016. – № 4. Спецвыпуск 2. – С. 123–134



Zeneca

[к содержанию](#)

Материалы, пригодные для BRCA-тестирования



Парафиновый гистологический блок с опухолевой тканью



Цельная кровь в пробирке с сиреневой крышкой (с ЭДТА)



Парафиновый гистологический блок с нормальной тканью

26 Памятка для врачей. Информационный портал молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний. [Электронный ресурс], 24.04.2017. URL: <http://www.cancergenome.ru/page105>



Гистологический блок для BRCA-тестирования: требования к материалу

Может быть получен как из **первичной опухоли**, так и из **метастазов**

Может использоваться как **биопсийный** так и **операционный** материал

К блоку нужно прилагать «**стекло-отпечаток**», полученное с этого блока

Не менее **20% клеток** в блоке должны быть опухолевыми (оптимум – 50%)

14 Памятка для врачей. Информационный портал молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний. [Электронный ресурс], 24.04.2017. URL: <http://www.cancergenome.ru/page105>



[к содержанию](#)

Гистологический парафиновый блок для BRCA-тестирования: требования к фиксации материала (1)

Фиксирующие растворы	
Идеальный	10%-ный нейтральный забуференный формалин (NBS)
Допустимые	этанол, ацетон
Нежелательные	фиксаторы Кларка и Замбони, формалин/этанол/уксусная кислота
Неприменимые	фиксаторы Ценкера, Карнуа, Буэна, кислые растворы (в т.ч. незабуференный формалин)

- Минимальное соотношение «фиксирующий раствор : образец» = **1:10**

Повторное применение фиксирующего раствора не допускается

Critical Steps in Tissue Processing in Histopathology, Recent Patents on DNA & Gene Sequences 2012, 6, 22-32; <http://www.cancergenome.ru/page40> Доступ 13 марта 2017 Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.Н., Артемьев В.Н.
29 Гистологическая техника: учебное пособие. – 3-е изд., доп. и перераб. – Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. – 290 с.

[к содержанию](#)

Гистологический парафиновый блок для BRCA-тестирования: требования к фиксации материала (2)

- **Время фиксации** зависит от размера образца:
 - начальная скорость проникновения формалина – около 1 мм/ч, но с глубиной падает до 1 см/сутки
 - кусочки **операционного** материала (стандартный размер около 3...5x10x10 мм) фиксируются **12-24** часа
 - минимальное время фиксации для кусочка толщиной 3 мм – 6 часов
 - **биоптаты** фиксируются не дольше **6-8** часов

31 Guidelines for molecular analysis in archive tissues, Editor Prof. Dr. Giorgio Stanta, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011; Maria Comanescu et al., Critical Steps in Tissue Processing in Histopathology, Recent Patents on DNA & Gene Sequences 2012, 6, 22-32; Special Stains and H & E, Second edition, 2010 Dako North America, Carpinteria, California



Данные лаборатории эпигенетики

Методом секвенирования следующего поколения протестировано более 1500 пациенток с раком яичника



Непригодно для анализа 55 образцов (3,7%)

17

AstraZeneca 

Выбор материала для BRCA-тестирования

[к содержанию](#)

33 *МГА – молекулярно-генетический анализ

iZeneca 

Методы, применяемые для BRCA-тестирования [к содержанию](#)

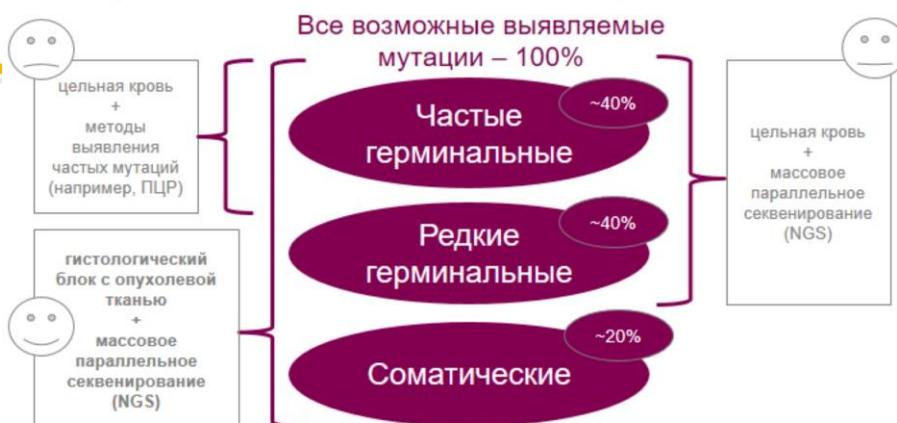
Метод	Выявляемые мутации	Комментарии	Применение
Секвенирование по Сэнгеру	все мутации, кроме крупных делеций/инсерций	Высокая трудоемкость. Стоимость сопоставима с NGS.	Ограничено
Пиросеквенирование	все мутации, кроме крупных делеций/инсерций	Относительно высокая трудоемкость, средняя стоимость (дороже ПЦР в реальном времени)	Применяется
Массовое параллельное секвенирование (NGS)	все мутации, кроме крупных делеций/инсерций	Высокая стоимость и трудоемкость. Требуется высокотехнологичное оборудование и хорошо обученный персонал.	Применяется
ПЦР в реальном времени	только те мутации, на которые направлена методика	Низкая стоимость. Выявляются только некоторые мутации (самые частые). Используется базовое оборудование (амплификатор). Много коммерческих наборов реагентов.	Широко применяется
Мультиплексная лигаза-зависимая амплификация зондов (MPLA)	крупные делеции/инсерции	Высокая трудоемкость интерпретации результатов. Необходимость фрагментного анализа. Возможность ложноположительных результатов	Ограничено
Высокоразрешающее плавление ампликонов (HRM)	все мутации в областях ампликонов	Скрининговый метод. Выявляется факт наличия мутации, но не ее положение. Требуется подтверждение результата секвенированием.	Применяется

34 Rizzo JM, Buck MJ. Cancer Prev Res 2012;5:887–900; Ellard S, et al. Clinical Molecular Genetics Society Practice Guidelines 2009; Walsh T, et al. PNAS 2010;107:12629–33; Grada A, Weinbrecht K. J Invest Dermatol 2013;133:e11; Palma M, et al. Crit Rev Oncol Hematol 2006;57:1–23; Larsson N, et al. EMQN Guidelines 2007; MRC-Holland.



iZeneca

Материалы, методы и выявляемые мутации [к содержанию](#)



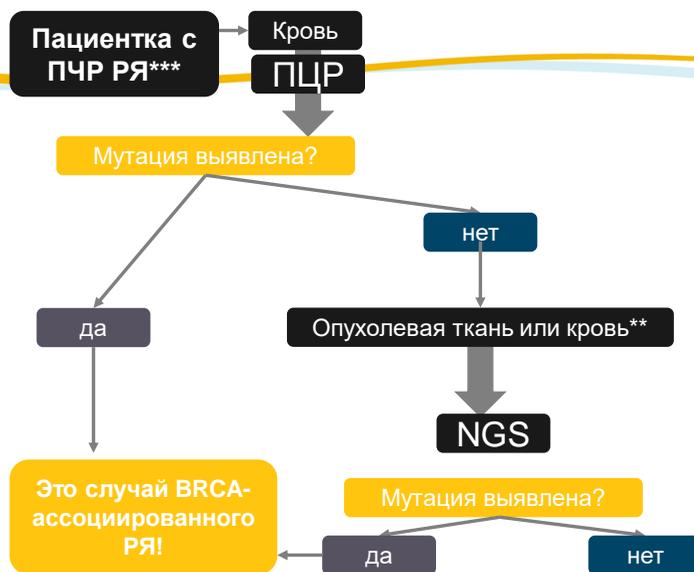
BRCA-тестирование с использованием ДНК, выделенной из опухолевой ткани, позволяет достичь максимального выявления случаев BRCA-ассоциированного рака

36 Brian T.J. Hennessy et al. J Clin Oncol 28:3570–3576.
Ramūnas Janavičius. EPMA Journal (2010) 1:397–412



iZeneca

Рекомендованный алгоритм BRCA-тестирования



21

Информационный портал молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний. [Электронный ресурс], 24.04.2017. URL: <http://www.cancergenome.ru>

[к содержанию](#)

AstraZeneca 

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

22

AstraZeneca 